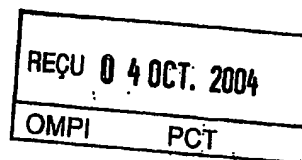




PCT/FR 2004/001662



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

MINISTÈRE

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉÉ PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 08/ 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 02 JUL 2003 LIEU 0308064 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 2 JUL. 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36 rue de St Pétersbourg 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) BL.Ocp644/107FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) UTILISATION DES N-ALKANOLS COMME ACTIVATEURS DU CANAL CFTR			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	3 rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	75008 PARIS Cedex 16	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 03 08 06 4 LIEU INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI - 2 JUL. 2003		Réservé à l'INPI
DB 540 W / 210502		
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom	ORES	
Prénom	Béatrice	
Cabinet ou Société	CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg
	Code postal et ville	75 00 018 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	01.53.21.11.00.	
N° de télécopie (facultatif)	01.53.21.08.88.	
Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com	
7 INVENTEUR(S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [] [] [] []		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint	<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Sulte», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

UTILISATION DES N-ALKANOLS COMME ACTIVATEURS DU CANAL CFTR

La présente invention est relative à une nouvelle utilisation des n-alkanols comme activateurs du canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) et à l'application de ladite utilisation aux traitements des pathologies dans lesquelles on observe un dysfonctionnement dudit canal, telles que la mucoviscidose.

La protéine CFTR, localisée dans la région apicale des cellules épithéliales, est un canal chlorure contrôlé par le niveau d'AMPc et impliqué dans l'hydratation des fluides sécrétés par les glandes sous-muqueuses. Un dysfonctionnement de ce canal CFTR est responsable de la mucoviscidose, maladie génétique autosomique récessive.

Dans les cellules épithéliales, les transports d'eau et d'électrolytes sont associés à une augmentation des perméabilités membranaires pour les ions K^+ , Na^+ et Cl^- . Ces mouvements d'eau et d'électrolytes sont liés à l'activité de protéines membranaires spécialisées (canaux ioniques, transporteurs) ayant une localisation précise dans la membrane plasmique de la cellule (pôle apical ou muqueux ; basolatéral ou séreux). Les techniques d'électrophysiologie moléculaire (patch-clamp) et de mesure de flux ioniques rendent possible l'étude des transports ioniques transépithéliaux, de leurs régulations et de leurs dérèglements pathologiques.

Un dysfonctionnement des cellules épithéliales et notamment celui des transports d'électrolytes est à l'origine de nombreuses physiopathologies, telle que la mucoviscidose ou fibrose kystique (*Cystic Fibrosis* (CF), dans la terminologie anglo-saxonne), qui est considérée comme une génopathie des glandes exocrines.

Le gène appelé CF impliqué dans la mucoviscidose a été identifié, cloné et localisé sur le bras long du chromosome 7 (Riordan et al., 1989). La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive la plus commune dans les populations caucasiennes. Aux Etats-Unis et dans la plupart des pays d'Europe, la fréquence des porteurs hétérozygotes du gène CF muté est de 1 sur 20 à 1 sur 30, ce qui représente une naissance d'un enfant malade sur 2500 à 3000 environ. Les progrès réalisés dans le domaine de la recherche médicale et biologique ont fait, depuis les années 60, considérablement progresser l'espérance de vie des patients atteints de

mucoviscidose, qui atteint aujourd'hui 30 ans environ. Le gène CF est constitué de 250.000 paires de bases définissant 27 exons et code pour la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), qui comporte 1480 acides aminés (Riordan et al., 1989). La mucoviscidose est une canalopathie, c'est-à-dire une pathologie liée à un dysfonctionnement de canaux ioniques, dans la mesure où la protéine CFTR a été caractérisée comme un canal chlorure. A l'heure actuelle, il a été déjà rapporté plus de 1300 mutations dans le gène CF, qui altèrent les propriétés et la fonction du canal CFTR.

La protéine CFTR est exprimée dans de nombreux organes dont le pancréas exocrine, les poumons, les glandes sudoripares, l'intestin, le tissu hépatique, l'appareil reproducteur, le rein et le tissu cardiaque.

L'intérêt porté à la mucoviscidose a eu des conséquences importantes pour la compréhension des mécanismes sécrétoires des cellules épithéliales normales. Les cellules épithéliales des glandes exocrines de différents organes, tels que l'intestin, le pancréas ou les poumons, contrôlent le transport de sel et d'eau dans les tissus. La protéine CFTR, qui est surtout localisée au pôle apical des cellules épithéliales, est un canal chlorure, de faible conductance, activé par la voie de l'AMPc.

La CFTR est impliquée dans l'hydratation des fluides sécrétés par les glandes sous-muqueuses et influencerait la sécrétion des mucines, glycoprotéines qui participent notamment à la formation du mucus bronchique.

Dans la mucoviscidose, le dysfonctionnement du canal CFTR affecte la sécrétion apicale d'ions Cl⁻, activée par l'AMPc. Le transport électrolytique, devenu anormal, provoque l'épaississement du mucus extracellulaire et entraîne ainsi des obstructions au niveau des lumières des différents tissus. Ces obstructions sont la cause de bronchites chroniques dues à des infections bactériennes pulmonaires opportunistes, des insuffisances pancréatique et hépatique, d'une sécrétion sudoripare anormalement concentrée et de l'infertilité masculine.

La protéine CFTR est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 170 kD comportant cinq domaines (Riordan et al., 1989) : deux domaines transmembranaires avec chacun 6 segments transmembranaires ou hélices α (numérotées de 1 à 12, comportant chacun de 21 à 22 acides aminés), deux domaines intracellulaires de

fixation des nucléotides (NBD1 et 2 pour *Nucleotide Binding Domain*) et un large domaine intracellulaire de régulation (domaine R).

La régulation de la CFTR a été particulièrement étudiée. Deux processus complexes contrôlent l'activité du canal CFTR : la phosphorylation du domaine R par des protéines kinases et la fixation et l'hydrolyse d'ATP sur les deux domaines NBD. La déphosphorylation du canal CFTR entraîne une perte d'activité du canal jusqu'à sa fermeture (Tabcharani et al., 1991 ; Becq et al., 1994).

Plusieurs études ont montré que la protéine CFTR a, en plus de son activité canal chlorure, de nombreuses autres fonctions cellulaires non encore élucidées. Elle régulerait d'autres canaux ioniques tels que le canal chlorure rectifiant sortant ORCC (Schwiebert et al., 1995), le canal sodium épithélial ENaC (Quinton et al., 1999) ou le canal chlorure dépendant du calcium CaCC (Wei et al., 1999). Elle aurait aussi une activité régulatrice sur la libération d'ATP de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (Schwiebert et al., 1995).

La CFTR partage une homologie de séquence et de structure, avec les transporteurs ABC (pour "ATP-binding cassette") qui constituent une grande famille de protéines membranaires très conservées dans l'évolution. Ces transporteurs sont impliqués dans la translocation de substrats variés à travers les membranes cellulaires. Cependant, alors que chez les procaryotes de nombreux couples transporteurs/substrats ont été définis, ces informations sont plus rares chez les eucaryotes. Chez les mammifères, on dénombre actuellement 48 transporteurs ABC dont les dysfonctionnements pourraient être associés à une pathologie. La glycoprotéine P (ou MDR pour *Multi Drug Resistance*) est impliquée dans le rejet de drogues cytotoxiques. La CFTR contrôle le transport de chlorure transépithélial et l'hydratation des compartiments muqueux, alors qu'une des isoformes de la MDR serait plutôt impliquée dans la translocation de la phosphatidylcholine.

Parmi les quelques 1300 mutations du gène CF recensées jusqu'à aujourd'hui et qui provoquent la mucoviscidose, la plus fréquemment retrouvée est une délétion de trois paires de bases dans une région codante (exon 10) du gène CF. Cette mutation correspond à la délétion, dans la protéine, d'une phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$) dans le domaine NBD1. La fréquence d'apparition de cette

mutation est de 70 % des allèles mutés en moyenne dans les analyses génétiques (Tsui et al., 1991) et 50% des patients sont homozygotes pour cette mutation. Les conséquences de cette mutation sont dramatiques car la protéine anormale issue de la transcription du gène muté ($\Delta F508$) n'est plus capable d'assurer ses fonctions dans le transport de chlorure des cellules épithéliales affectées. L'absence de courant chlorure après stimulation des cellules épithéliales des glandes exocrines par l'AMPc est la principale caractéristique montrant la présence d'une anomalie sur le gène CF et notamment de la mutation ($\Delta F508$). La densité de mutations la plus élevée se trouve dans les deux domaines de fixation des nucléotides (NBD1 et NBD2). Sept autres mutations importantes sont présentes avec des fréquences supérieures à 1 %. La mutation G551D correspond à la substitution d'un résidu glycine (G) en position 551 de la protéine par un acide aspartique (D). Les patients CF porteurs de ce mutant ont une pathologie sévère avec une insuffisance pancréatique et des troubles pulmonaires graves (Cutting et al., 1990). La fréquence d'observation de cette mutation atteint 3 à 5 % chez certaines populations de patients atteints de mucoviscidose. A l'inverse de la délétion $\Delta F508$, la protéine CFTR portant la mutation G551D est mature et est incorporée dans la membrane (Gregory et al., 1991). Cependant, la mutation entraîne une imperméabilité membranaire et la stimulation de la voie de l'AMPc n'ouvre pas le canal associé à l'expression de ce mutant (Gregory et al., 1991 ; Becq et al., 1994). D'autres mutations comme R117H, R334W et R347P apparaissent avec des fréquences basses de 0,8, 0,4 et 0,5% respectivement et sont associées à des pathologies moins sévères (Sheppard et al., 1993). Ces trois mutants expriment une protéine CFTR mature, glycosylée permettant son insertion dans la membrane. Cependant l'amplitude du courant, la conductance unitaire et la probabilité d'ouverture du canal, associées avec chacune des trois mutations, sont modifiées (Sheppard et al., 1993 ; Becq et al. 1994). La régulation par la voie de l'AMPc semble toutefois normale pour ces trois différents mutants, y compris pour $\Delta F508$ (Becq et al., 1994).

Les porteurs hétérozygotes du gène CF, c'est-à-dire ayant une copie du gène normal et une copie du gène muté, sont généralement sains et représentent environ 5 % de la population caucasienne. Un avantage sélectif est suggéré pour expliquer le pourcentage relativement élevé de cette mutation à l'état hétérozygote au

cours de l'évolution. Les personnes hétérozygotes auraient été plus résistantes à des épidémies de fièvre typhoïde, de choléra, de tuberculose ou de diarrhées sécrétoires.

- Cependant une corrélation entre porteurs hétérozygotes pour le gène CF et susceptibilité à développer des pathologies diverses, telles que l'asthme, des polyposes nasales, des sinusites et bronchites chroniques, des bronchectasies, des aspergilloses bronchopulmonaires allergiques ou des pancréatites a été établie par certains travaux (Griesenbach et al., 1999). Des mutations survenant dans des régions flanquantes entre exons-introns du gène CF ont également été décrites. Par exemple, il existe des variants polymorphiques 9-, 7- ou 5- thymidines entre l'intron 8 et l'exon 9.
- 10 Le variant polymorphique 5T diminue la synthèse de la protéine CFTR, au demeurant normale. L'association du variant 5T sur un allèle avec une mutation de CFTR sur l'autre allèle conduit à une agénésie congénitale de canaux déférents (ACCD), se caractérisant chez le patient masculin par une infertilité sécrétoire sans aucun autre trouble classique de mucoviscidose. Une certaine proportion d'hommes stériles
- 15 pourrait en fait être porteurs de ces mutations dans le gène CF, sans développer la mucoviscidose proprement dite.

- Cette découverte ouvre un débat sur le diagnostic et la classification de la mucoviscidose, lié aux désordres physiologiques répertoriés chez des individus hétérozygotes. On pourrait ainsi définir, à côté des cas de mucoviscidose classique,
- 20 des cas atypiques :

- Dans le cas classique, les patients homozygotes malades, (e.g. $\Delta F508/\Delta F508$) ou hétérozygotes composites (e.g. $\Delta F508/G551D$) présentent la majorité des troubles caractérisés par cette maladie.
 - Dans les cas atypiques, les patients, hétérozygotes composites
- 25 ($\Delta F508/5T...$) ou hétérozygotes vrais, montrent des troubles divers : ACCD, asthme, sinusites chroniques, etc..., tels que précisés ci-dessus.

- Afin de pallier le déficit en protéines CFTR fonctionnelles, aussi bien dans les cas classiques de mucoviscidose que dans les cas atypiques marqués par différents troubles (asthme, bronchectasies, sinusites...), il peut être envisagé d'activer
- 30 pharmacologiquement la protéine CFTR sauvage encore présente (hétérozygotes), et les mutants, tels que $\Delta F508$ ou $G551D$, insérés dans la membrane, mais inactifs. Malgré un défaut d'adressage de la protéine $\Delta F508$ dans les membranes de cellules

épithéliales affectées par la mucoviscidose, plusieurs groupes ont montré que cette protéine pouvait être fonctionnellement présente, en petit nombre, dans les membranes (Dalemans et al., 1991 ; Drumm et al., 1991 ; Becq et al., 1994).

Ainsi, l'utilisation d'activateurs du canal CFTR et notamment
5 d'ouvriers du canal CFTR peut optimiser les chances de succès d'une pharmacothérapie des maladies liées à un dysfonctionnement du canal CFTR.

Malgré les progrès réalisés dans la génétique de la mucoviscidose et dans la biologie et la biochimie de la protéine CFTR, la pharmacologie des ouvriers du canal CFTR est peu développée.

10 Plusieurs études ont montré qu'en plus des agents généraux bien connus pour activer la protéine CFTR par la voie de l'AMPc, tels que la forskoline (FSK), il était possible d'utiliser d'autres molécules pour activer les canaux CFTR. Le mode d'action de ces activateurs est encore peu connu et leurs effets limités.

On peut citer les quelques familles de molécules aujourd'hui
15 connues pour leurs propriétés d'activateurs ou d'ouvriers du canal CFTR :

- Les phénylimidazothiazoles (lévamisole et bromotétramisole) (Becq et al., 1994). Il a été montré que le lévamisole et le bromotétramisole permettent de contrôler l'activité et le niveau de phosphorylation du canal CFTR. Toutefois, ces molécules ne semblent pas pouvoir agir dans toutes les cellules. De plus, dans un
20 modèle de souris transgéniques présentant la mutation G551D/GS51D, le bromotétramisole n'a pas eu l'effet activateur attendu.

- Les benzimidazolones (NS004) (Gribkoff et al., 1994). Ces composés, dérivés du noyau imidazole comme le lévamisole peuvent, dans certaines conditions, et notamment lorsque le canal CFTR a été phosphorylé, ouvrir le canal.
25 Les benzimidazolones sont toutefois également activateurs de nombreux canaux potassium (Olesen et al., 1994) et sont, de ce fait, peu spécifiques du canal CFTR.

- Les xanthines substituées comme l'IBMX (3-isobutyl-1-méthyl-xanthine) ou la théophylline sont d'abord connus comme des inhibiteurs des phosphodiesterases intracellulaires (enzymes de dégradation de l'AMPc), de phosphatases
30 ainsi que des antagonistes des récepteurs membranaires fixant l'adénosine ; elles agissent en outre sur la mobilisation du calcium intracellulaire. Indépendamment de ces propriétés ce sont des activateurs du canal CFTR (Chappe et al., 1998). Le méca-

nisme d'action des xanthines sur le CFTR est encore mal connu mais pourrait impliquer leur fixation sur les domaines de fixation des nucléotides (NBD1 et NBD2).

- Les benzo(c)quinolizinium (Demande internationale PCT WO 98/05642 ; Becq et al., 1999) qui sont davantage spécifiques du CFTR mais peuvent induire des effets indésirables ; en effet, ces molécules activent le canal CFTR par une voie indépendante de l'AMPc. Cependant, à l'heure actuelle, les tests de toxicité relative à cette famille de molécules n'ont pas encore été effectués et il n'est pas improbable que ces molécules puissent se révéler avoir des effets toxiques sur l'animal.

Ainsi, l'ensemble des traitements actuellement préconisés, soit
10 manquent de spécificité, soit entraînent trop d'effets indésirables.

C'est pourquoi la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à des médicaments qui activent spécifiquement le canal chlorure CFTR, tout en ne modifiant pas le taux de base de l'AMPc, destinés au traitement de pathologies associées à des troubles des flux ioniques transmembranaires, notamment de chlorure, et
15 notamment dans les cellules épithéliales chez l'homme ou l'animal.

La présente invention a plus particulièrement pour but de fournir de nouveaux médicaments susceptibles d'être utilisés dans le cadre du traitement de la mucoviscidose, des cas de "mucoviscidose atypiques" (asthme, sinusites chroniques, bronchectasies...), de la prévention ou du traitement des obstructions des voies
20 bronchiques ou des voies digestives (notamment pancréatique ou intestinale), de maladies cardio-vasculaires ou encore rénales.

Les Inventeurs ont en effet trouvé, de manière surprenante, que certains n-alkanols activent spécifiquement le canal chlorure CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). L'activité du canal CFTR est mesurée à
25 l'aide de la technique d'efflux d'iodure radioactif (^{125}I) ou de la technique de patch-clamp. L'ordre d'activation de CFTR par les n-alkanols est hexanol-1 < heptanol-1 < octanol-1 < octanol-2 < décanol-1 (1 mM).

La présente invention a, en conséquence, pour objet l'utilisation des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, ou cycliques en C_6 -
30 C_{10} , pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies associées à des troubles des canaux chlorure CFTR (flux chlorures transmembranaires), notamment dans les cellules épithéliales, chez l'homme ou l'animal.

Le fait que les n-alkanols en C₆-C₁₀ ne modifient pas le niveau d'AMPc des cellules est un avantage pour au moins deux raisons :

- cela est en faveur d'une spécificité d'interaction entre les n-alkanols et le canal CFTR

5 - cela permet d'éviter des effets secondaires et non spécifiques qui peuvent être induits par une augmentation d'AMPc dans les cellules.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, dans lesquels le groupe OH est en position 1 (alcool primaire) ou en position 2 (alcool
10 secondaire).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées cycliques portant un ou plusieurs groupements alcool (cyclohexane, par exemple).

15 Les n-alkanols présentent, dans cette application, un certain nombre d'avantages :

- aucune activation par les n-alkanols n'est détectée dans des cellules CHO contrôles qui n'expriment pas de CFTR, alors que l'activation de CFTR par les n-alkanols dans des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) exprimant le canal CFTR est bloquée par l'ajout de glibenclamide (100 µM), utilisé pour bloquer spécifiquement le canal CFTR.

20

- les n-alkanols ne modifient pas le niveau de base d'AMPc ; les n-alkanols activent ainsi spécifiquement le canal CFTR par une voie indépendante de l'AMPc. L'activation du CFTR par les n-alkanols est indépendante de l'effet potentiel de ces molécules sur le découplage cellulaire.

25 - les n-alkanols agissent par un mécanisme indépendant de la protéine kinase C.

Parmi les n-alkanols, c'est surtout l'octanol qui a déjà été proposé dans de nombreuses applications :

1. comme molécules anesthésiques ; il exerce des effets complexes
30 sur les membranes biologiques. Une théorie physico-chimique avait été avancée pour expliquer la puissance effectrice des anesthésiques. L'efficacité des anesthésiques augmenterait en fonction de leur solubilité dans les graisses et serait une fonction

linéaire du coefficient de partition octanol-eau (la loi de Meyer-Overton sur l'anesthésie). En fait les mécanismes impliqués dans les effets des n-alkanols ne sont pas élucidés. Cependant, deux hypothèses générales ont été proposées pour expliquer les effets des n-alkanols sur les protéines associées aux membranes biologiques :

5 - La première suggère que les n-alkanols altèrent les propriétés physiques de la membrane, propriétés nécessaires au fonctionnement normal des protéines membranaires.

 - La deuxième suggère que les n-alkanols se fixent directement dans des régions hydrophobes spécifiques des protéines (Mascia et al., 2000).

10 Il est probable que les deux mécanismes interviennent. Cependant, c'est actuellement la deuxième hypothèse qui retient l'intérêt, la première ayant été contredite par des expériences qui montrent que les perturbations de la fluidité membranaire, engendrées par les n-alkanols, étaient mimées par une augmentation de température corporelle (fièvre), sans pour autant observer les mêmes effets sur
15 l'activité électrique.

 Une caractéristique commune de l'action de ces molécules est la modulation du signal électrique qui est due à l'altération de la conductance membranaire par les canaux ioniques.

 2. dans la régulation du récepteur-canal Cl^- au GABA (acide
20 gamma-aminobutyrique) (Narahashi et al., 1998 ; Marszalec et al., 1994 ; Nakahiro et al., 1991). Ces récepteurs sont exprimés au niveau du système nerveux central.

 3. comme broncho-dilatateurs : les n-alkanols interviennent dans la relaxation des muscles lisses des voies aériennes en diminuant notamment la concentration intracellulaire de calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Sakihara et al., 2002).

25 4. action au niveau des jonctions cellulaires en altérant la conductance des jonctions communicantes dans de nombreux tissus y compris le tissu épithélial (Weingart et al., 1998) ; cet effet concerne plus spécifiquement les agents lipophiles, tels que les n-alkanols à longue chaîne. Le mécanisme moléculaire résultant du découplage cellulaire demeure obscur.

30 5. Les alcools tel que l'octanol, comme agents anti-émulsifiants, ont déjà été utilisés, en aérosol, chez des patients souffrant d'oedèmes pulmonaires (Miller et al., 1973), mais leurs mécanismes d'action demeurent inconnus.

L'utilisation de certains n-alkanols, dans le traitement des pathologies associées à des troubles des flux ioniques transmembranaires de chlorure dans les cellules épithéliales et notamment de la mucoviscidose et des mucoviscidoses atypiques vient d'être trouvé par les Inventeurs.

5 En effet, de manière surprenante, les n-alkanols en C₆-C₁₀, notamment nébulisées dans les bronches des patients sous forme d'aérosol ou de nébulisat, activent ou potentialisent l'activité de canaux CFTR sauvages ou mutés mais présents à la membrane des cellules notamment chez des patients atteints de mucoviscidose.

10 L'activation du canal CFTR par les n-alkanols, pourrait en outre favoriser un effet broncho-dilatateur au niveau des fibres musculaires lisses des bronches et bronchioles, et contribuer à l'amélioration de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose aussi bien que des patients atteints d'insuffisance respiratoire, non liée à une mucoviscidose, telle que l'asthme.

De manière générale, lesdits n-alkanols peuvent être administrés par
15 voie parentérale : administration intradermique, intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée ; par voie intra nasale et buccale : aspiration ou nébulisation par aérosol ; par voie orale ; par voie sublinguale.

De manière préférée, lesdits n-alkanols sont administrés sous une forme adaptée à une administration intra nasale ou buccale, de manière à obtenir un
20 contact direct entre lesdits n-alkanols et la surface des muqueuses broncho-pulmonaires. Par exemple, lesdits n-alkanols sont présentés sous une forme liquide, pour une administration sous la forme d'un aérosol ou sous la forme d'un nébulisat, et ce à l'aide d'un dispositif de nébulisation, du type de ceux utilisés aussi bien dans le traitement de l'asthme que dans celui de la mucoviscidose.

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdits n-alkanols sont associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable adapté à ladite administration intra nasale ou buccale.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdits n-alkanols sont de préférence administrés à une concentration comprise entre 0,001 %
30 et 0,1 % (v/v), correspondant à une valeur comprise entre 10 et 1000 ppm (parties par million), soit de 10 mg/kg à 1 g/kg.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'utilisation objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

5 - la figure 1 illustre : (A) Comparaison de l'effet de l'octanol-1 et de la FSK sur l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction du temps (min, en abscisse) dans les cellules CHO-CFTR(+). (B) Effet de l'octanol-1 et de la FSK sur l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée) en fonction du temps (min en abscisse) dans les cellules contrôles CHO-CFTR(-). (C) Effet de l'octanol-1 (0,25 à 5 mM) et de la FSK (5 μM) sur l'efflux de ^{125}I (vitesse d'efflux en ordonnée) dans les cellules contrôles CHO CFTR(-) (D) Effet de l'inhibition spécifique de CFTR par 100 μM de glibenclamide sur l'efflux de ^{125}I (vitesse d'efflux en min^{-1} en ordonnée) stimulé par l'octanol-1, la FSK ou l'octanol-1 et la FSK, dans les cellules CHO-CFTR(+).

15 - la figure 2 illustre l'effet de doses croissantes (en abscisse) de FSK ou d'octanol-1 sur l'efflux de ^{125}I (vitesse d'efflux en min^{-1} en ordonnée) dans les cellules CHO-CFTR(+).

20 - la figure 3 illustre : (A) Effet de la FSK (1 μM) en présence et en l'absence de glibenclamide (100 μM) sur le courant enregistré en configuration cellule entière, représentant l'activation du canal CFTR. (B) Effet de l'octanol-1 (1 mM) sur le courant induit par l'activation de CFTR, en présence et en l'absence de glibenclamide (100 μM) pour inhiber spécifiquement le canal CFTR. L'enregistrement est effectué dans les cellules CHO-CFTR(+), $n = 4$.

25 - la figure 4 illustre : (A) Effet de la longueur de la chaîne hydrocarbonée des n-alkanols (en abscisse) dans l'activation de l'efflux de ^{125}I (vitesse d'efflux en min^{-1} en ordonnée). (B) Effet de l'octanol-2 sur l'activation de l'efflux de ^{125}I (vitesse d'efflux en min^{-1} en ordonnée).

- la figure 5 illustre l'effet de l'octanol-1 (1 mM) et de l'acide 18-alpha glycerrhetinique (α -GA 10 μM) sur la réponse calcique induite par une stimulation d'ATP qui met en jeu la communication intercellulaire.

30 - la figure 6 illustre l'effet du découplage cellulaire dans l'activation de l'efflux de ^{125}I (% en ordonnée), par une application d'acide 18-alpha glycerrhetinique (α -GA 10 et 100 μM) ($n = 12$), en comparaison à l'effet de l'octanol-1.

- la figure 7 illustre : (A) Effet de l'inhibition de la protéine kinase A par du H-89 (30 μ M, 30 min) sur l'activation de l'efflux de 125 I (taux d'efflux en min^{-1} en ordonnée) induite par l'octanol-1 (1 mM), la FSK (1 μ M) ou une co-stimulation octanol-1 + FSK. (B) Effet de l'inhibition de la protéine kinase C (GF109203X, 100 nM, 30 min) sur l'activation de l'efflux de 125 I (taux d'efflux en min^{-1} en ordonnée) induite par l'octanol-1 (1 mM).

- la figure 8 illustre l'effet des n-alkanols sur le niveau de l'AMPc intracellulaire total en comparaison au niveau basal et à une stimulation par de la FSK (5 μ M).

- la figure 9 illustre : (A) Effet de l'octanol-1 (1 mM) sur l'efflux d'iodure (min^{-1}) en fonction du temps (min) dans les cellules épithéliales humaines d'origine bronchiques Calu-3, avec (n = 8) ou sans prétraitement par du glibenclamide (100 μ M, 1 heure) (n = 8), et avec (n = 8) ou sans prétraitement par du DIDS (500 μ M, 1 heure) (n = 8). La flèche représente le moment où l'octanol-1 (1 mM) est ajouté, avec ou sans glibenclamide et avec ou sans DIDS. (B) L'effet maximum de l'octanol-1 est normalisé à 100 %. Effet du traitement par du DIDS (500 μ M, 1 heure) ou du glibenclamide (100 μ M, 1 heure) sur la réponse maximale de l'octanol-1, le niveau basal est indiqué. (Test t : *** P < 0.001 ; ns : non significatif). (C) Effet de doses croissantes (en abscisse) d'octanol-1 en présence ou non de FSK (1 μ M) sur l'efflux de 125 I (vitesse d'efflux en min^{-1} en ordonnée) dans les cellules Calu-3. (D) Courbe dose-réponse d'octanol-1 (n = 8 pour chaque concentration testée) en présence ou en absence de FSK (1 μ M), représentée en % du maximum d'activation obtenue pour 10 mM d'octanol-1. La concentration de demi-effet (EC_{50}) de l'octanol-1 est de 512 μ M en présence de FSK (1 μ M) et de 1,14 mM en absence de FSK (1 μ M).

- la figure 10 illustre : (A) Effet de l'octanol-1 (1 mM) (n = 8) ou d'un cocktail de drogues utilisé pour activer de façon maximale le canal muté CFTR- Δ F508 (FSK 10 μ M plus génistéine (GST) 30 μ M) (n = 8) sur l'efflux d'iodure (min^{-1}) en fonction du temps (min) dans les cellules épithéliales bronchiques humaines JME/CF15 extraites à partir de patients atteints de mucoviscidose. La flèche représente le moment où l'octanol-1 (1 mM) ou la FSK 10 μ M + GST 30 μ M sont ajoutés. (B) Représentation du pourcentage d'activation de CFTR- Δ F508 obtenu avec l'octanol-1 (1 mM) par rapport à l'activité maximale obtenue avec le cocktail FSK

10 μM + GST 30 μM , qui est normalisée à 100 % de la réponse maximale. (C) Effet du prétraitement par du glibenclamide (100 μM , 1 heure) ($n = 8$) ou du prétraitement par du DIDS (500 μM , 1 heure) ($n = 8$) sur la réponse maximale (normalisée à 100 % d'activation) obtenue avec 1 mM d'octanol-1 (Test t : *** $P < 0.001$; ns : non significatif).

- la figure 11 illustre la réversibilité de l'effet de l'octanol-1 (1 mM) sur l'activation de CFTR étudiée par patch-clamp en configuration cellule entière dans les cellules CHO-BQ1. Famille de courants évoquée dans une cellule CHO-BQ1 par des dépolarisations successives entre -80 et +15 mV à partir d'un potentiel de maintien de -60 mV et par incrémentation de 5 mV, en absence (contrôle), en présence d'octanol-1 (1 mM) et après 15 min de lavage de l'octanol-1 par un milieu salin physiologique de rinçage.

- la figure 12 illustre la structure des n-alkanols en $\text{C}_2\text{-C}_{10}$.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple : Mise en évidence des propriétés des n-alkanols comme ouvreurs ou activateurs de CFTR

1) Méthodes expérimentales.

1.1) Cellules en culture.

Les études sur la CFTR sont d'une part réalisées sur des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) qui expriment la protéine CFTR humaine recombinante (CHO-CFTR(+)) (Riordan et al., 1989). Ces cellules sont cultivées à 37°C dans une étuve saturée en eau contenant 5% de CO_2 dans du milieu αMEM additionné de sérum de veau foetal (7,5 %), de 2 mM glutamine, de 50 I.U/ml de pénicilline et de 50 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine. Les cellules qui n'expriment pas la CFTR sont notées CHO-CFTR(-) et sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 dans les mêmes conditions que précédemment.

Les études de CFTR sont aussi réalisées sur les cellules Calu-3 (ATCC n° HTB-55) qui sont des cellules épithéliales pulmonaires humaines exprimant de façon endogène le canal CFTR. Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions de culture que les cellules CHO. L'étude du canal CFTR muté est réalisée

sur les cellules JME/CF15, cellules épithéliales extraites de voies aériennes respiratoires de patients atteints de mucoviscidose (homozygote $\Delta F508$) (Jefferson et al., 1990). Ces cellules expriment donc le canal CFTR muté $\Delta F508$. Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que précédemment mais le milieu de culture est
5 supplémenté avec un mélange hormonal contenant : adénine (180 μM), insuline (5 $\mu g/ml$), transférine (5 $\mu g/ml$), hydrocortisone (1,1 μM), triiodothyronine (2 nM), épinéphrine (5,5 μM), facteur de croissance épidermique (1,64 nM).

1.2) Technique du patch-clamp, appliquée à l'étude des cellules en culture.

10 La technique du patch-clamp consiste à appliquer une pipette ou une microélectrode de verre à la surface d'une cellule. En aspirant légèrement, il est possible de faire adhérer la membrane au verre. Un petit morceau de membrane (patch) est ainsi isolé au bout de la pipette : c'est le principe du patch-clamp (O.P. Hamill et al. Pflügers Arch., 1981, 391, 85-100 ; R. Penner , A Practical Guide to
15 Patch Clamping, 1995, In Single Channel Recording, 2^{ème} édition (Eds. B. Sakamnn et al.) Plenum Press, New York, 3-30). Pour ce faire, la pipette de patch-clamp doit avoir une pointe de l'ordre de 1 μm de diamètre et une résistance de l'ordre de 1-5 M Ω . La résistance d'une pipette ou d'une microélectrode permet d'apprécier la finesse de la pointe : plus la résistance est grande, plus la pointe est fine ou l'électrode est bouchée.
20 Le diamètre de la pipette de patch-clamp ne permet pas de pénétrer dans la cellule mais par contre, il permet effectivement d'emprisonner un morceau de membrane dans la pointe. Des interactions entre la membrane et le verre vont se former, aidées par une légère succion ou pression négative de la pipette. La qualité de cette interaction (ou scellement) est également appréciée en mesurant la résistance entre le
25 verre et la membrane. Pour mesurer des courants globaux en configuration cellule entière, une résistance de scellement de 1 G Ω est suffisante.

De manière générale, on mesure des enregistrements de courant électrique à travers un patch contenant, par exemple, un canal. Le potentiel de membrane imposé (E_{clamp}) est généralement en millivolts. Lorsque le canal est fermé
30 le courant oscille faiblement autour d'un niveau de base (état F). Cet infime courant de base circule dans les « fuites » entre le patch et l'extrémité de la pipette. Lorsque le

canal s'ouvre (état O), le courant saute à un autre niveau, puis revient au niveau de base quand le canal se ferme et ainsi de suite.

Les mesures peuvent être réalisées dans l'une des configurations suivantes : cellule attachée (*cell-attached*), cellule entière (*whole-cell*), patch excisé
5 intérieur-extérieur (*inside-out*) ou patch excisé extérieur-extérieur (*outside-out*).

Les expériences de patch-clamp sont effectuées sur des cellules confluentes.

De manière plus précise, les boîtes de culture (support des cellules) sont placées dans une cuve d'expérimentation (volume 1 ml) sur la platine d'un
10 microscope inversé (Nikon) équipé avec un éclairage en contraste de phase. La configuration cellule entière (*whole-cell*) est utilisée pour l'enregistrement des courants cellulaires (Hamill et al., 1981). Les expériences sont réalisées à température ambiante (20-22°C). Les courants sont amplifiés avec un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instrument LTd) possédant un filtre passe-bas de 2-5 kHz (filtre Bessel à 6 pôles) et
15 enregistrés sur le disque dur d'un ordinateur PC après digitalisation à 10-25 kHz. La fabrication des pipettes s'effectue à partir de tubes de verre de 1 mm de diamètre (Clark Electromedical Instrument) en quatre étapes avec une étireuse horizontale (Bruvn Flaming 97, CA).

Les pipettes, remplies d'une solution intracellulaire contenant en
20 mM : 60 KCl; 80 NMDG (N-méthyl-G-glucamine); 10 HEPES ; 5 EGTA ; CaCl₂ 1; MgATP 4; Na₃GTP 0,2; pH 7,4 titré avec KOH), ont une résistance de 5 MΩ. Les potentiels sont exprimés comme la différence entre le potentiel de l'électrode de patch et celui du bain. En configuration cellule entière, ils représentent le potentiel de la membrane de la cellule. Les potentiels de jonction qui se forment entre l'électrode
25 d'enregistrement et le milieu extracellulaire sont annulés avant le contact de l'électrode avec la cellule. Le potentiel d'inversion du courant chlore est obtenu à partir de l'équation de Nernst ($E_{rev} = (RT/F) \log ([Cl]_i/[Cl]_e)$) ; i et e concentration ionique intracellulaire et extracellulaire, R, T et F ont leur signification habituelle. Les relations courant-voltage à l'état stationnaire sont déterminés en utilisant des rampes
30 lentes (20 mV/s) de voltage en condition de voltage imposé.

La solution extracellulaire d'enregistrement est constituée (en mM) : 110 NaCl ; 23 NaHCO₃ ; 3 KCl ; 1,2 MgCl₂ ; 2 CaCl₂ ; 5 HEPES ; 11 D-glucose ; gazée avec du CO₂ 5 % - O₂ 95 % ; pH 7,4.

5 1.3) Mesure des flux de traceurs radioactifs appliquée à l'étude des cellules épithéliales en culture.

Le canal CFTR étant perméable aux halogénures (Br > Cl > I > F⁻), la mesure d'efflux d'iodure radioactif ¹²⁵I s'est révélé être une technique efficace pour mesurer l'activité du canal CFTR (Chang et al., 1998). Cette technique permet de suivre la cinétique de sortie de l'iodure radioactif ¹²⁵I. Les cellules sont cultivées dans
10 des plaques 24 puits avec une dilution au 1/10 après passage. Le quatrième jour de culture, les drogues à tester sont mises en solution en fonction de la concentration voulue, à 37°C, dans du milieu B à pH 7,4, contenant en mM : 137 NaCl, 5,36 KCl, 0,8 mM MgCl₂ 1,8 mM CaCl₂, 5,5 glucose et 10 HEPES-NaOH. Les puits sont lavés 4 fois avec 500 µl de milieu B. La solution est ensuite remplacée par 500 µl de solu-
15 tion de charge contenant 1 µM KI et 0.5 µCi de ¹²⁵INa/ml pendant 30 min. La cinétique de sortie de ¹²⁵I est réalisée après avoir éliminé la solution de charge et lavé 4 fois les puits par 500 µl de milieu B. Pour la cinétique de sortie de ¹²⁵I, 500 µl de milieu B contenant ou non les molécules à tester sont incubés 30 sec dans le puits et récupérés dans un tube à hémolyse pour être remplacés par 500 µl de milieu B conte-
20 nant ou non les molécules à tester. L'opération est répétée toutes les 30 s pendant 2 à 6 min. A la fin de l'efflux, les ions intracellulaires sont extraits en ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique (7,5 %) sur la couche cellulaire. Tous les échantillons sont comptés dans un compteur gamma (Kontron). Les protéines précipitées sont solubilisées dans 0,1 N NaOH et quantifiées en utilisant un test colorimétrique.

25 1.4) Analyse des données

Le traceur contenu dans la couche cellulaire au début de l'efflux est calculé comme la somme des échantillons et des extraits comptés. Les courbes d'efflux sont construites en exprimant le pourcentage du contenu restant dans la couche cellulaire (I%) par rapport au temps. Les constantes de taux d'efflux (k, min⁻¹)
30 stimulé ou non sont déterminés en lissant les courbes d'efflux en une fonction mono-exponentielle $I\% = 100 \cdot \exp(-kt)$ en utilisant une régression linéaire du logarithme

népérien des données, k est utilisé pour calculer l'iodure libéré dans le milieu par rapport au temps. L'hypothèse est faite que, en présence d'un stimulateur, l'efflux est la somme de deux efflux d'iodure survenant en parallèle : un efflux basal et un efflux stimulé caractérisé respectivement par les constantes k_b et k_s . L'efflux net total est alors décrit par l'équation $I_t\% = 100 \cdot (1 - \exp(-k_t t))$ où k_t est la somme de k_b et k_s . Finalement, k_s calculée comme $k_t - k_b$ est utilisée pour établir une relation dose-réponse pour des antagonistes. Les données sont exprimées comme des moyennes \pm SD, et le test- t est utilisé pour déterminer les significativités. Les courbes concentration-réponse d'agonistes ou d'antagonistes sont lissées en utilisant l'équation hyperbolique $Y = Y_{\max} \cdot X / (EC_{50} + X)$, où Y est la réponse. Y commence au basal et va jusqu'au plateau (Y_{\max}), X est la concentration et les valeurs de demi-effet (EC sont calculées en utilisant GraphPad Prism v3.0 (GraphPad Software).

1.5) Dosage de l'AMPc intracellulaire total

Les cellules CHO sont cultivées pendant quatre jours dans une plaque de culture de 24 puits. Au quatrième jour de culture, chaque puits est rincé deux fois avec 500 μ l de milieu B, et 500 μ l de ce tampon contenant la molécule à tester sont ajoutés à chaque puits. Après 5 min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée en ajoutant un tampon de lyse cellulaire. La lyse cellulaire est vérifiée au bleu Trypan. La quantité d'AMPc contenue dans les cellules est déterminée en utilisant le kit de dosage *Enzyme Immuno Assay* (Amersham Biotechnology). Le niveau d'AMPc est exprimé en pmoles/puits \pm SD.

1.6) Imagerie cellulaire et mesure de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)

Les mesures de Ca^{2+} sont réalisées en présence de fura-2 (sonde fluorescente imperméante) qui lie le Ca^{2+} . Les cellules sont incubées dans du milieu de culture DMEM/F12 sans sérum en présence de la forme perméante du fura-2 (fura-2/AM, 2,5 μ M) pendant 1h à 37°C. Les cellules placées sur la platine d'un microscope (Olympus) à épifluorescence (objectif 20 X), sont perfusées avec les solutions à tester (e.g ATP, octanol). Elles sont séquentiellement illuminées à 340 nm et 380 nm et la fluorescence émise (F) est mesurée à 510 nm. Elle est détectée via une caméra CCD 12-bits (Sony) connectée à une unité informatique pour le traitement des données (TILL Photonics). La concentration de Ca^{2+} intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ est calculée en utili-

sant l'équation de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) : $[Ca^{2+}]_i = K_d * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, à partir de l'analyse ratiométrique R (340/380 nm) de la fluorescence (TILL Vision) ; R_{max} et R_{min} désignent le rapport de fluorescence mesuré en présence ou en l'absence de Ca^{2+} .

5

2) Résultats

Les concentrations des n-alkanols mises en oeuvre vont de 0,1 à 10 mM. Ces concentrations représentent des proportions finales (v/v) de 0,001 % (pour 0,1 mM d'alcools) à 0,1 % au maximum (pour 10 mM d'alcools).

2.1) L'octanol active spécifiquement le canal CFTR

10

Les molécules testées sont les n-alkanols et notamment l'octanol-1, qui ont été testées pour leur capacité à activer le canal CFTR.

Le criblage des molécules en tant qu'ouvriers du canal CFTR a été réalisé en mesurant leur effet sur l'efflux d'iodure radioactif ^{125}I et sur les courants de chlorure transmembranaires. Ces données ont été complémentées par la mesure du
15 taux d'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire et de ses variations dans diverses situations expérimentales

L'évaluation de l'effet d'activation du CFTR par les n-alkanols est tout d'abord réalisée sur la lignée cellulaire CHO-CFTR(+). Les cellules CHO-CFTR(-) n'exprimant pas la protéine CFTR ont été utilisées comme cellules contrôles.
20 L'A23187 (2 μM) (un ionophore de calcium) est sans effet sur l'efflux de ^{125}I aussi bien dans les cellules CHO-CFTR(+) que CHO-CFTR(-), montrant qu'il n'y a pas de canaux Cl^- dépendants du calcium intracellulaire (Chappe et al., 1998). Le canal CFTR étant principalement régulé par des protéines kinases A, les expériences contrôles ont fait appel à la FSK pour stimuler le taux d'AMPc intracellulaire.

25

La figure 1A montre une activation de CFTR obtenue par une application soit de 1 μM de FSK (FSK), d'octanol-1 (1 mM) ou une application combinée de FSK (1 μM) et d'octanol-1 (1 mM) dans des cellules CHO-CFTR(+). L'activation du canal CFTR, mesurée par l'efflux de ^{125}I induit une augmentation de l'amplitude de l'efflux d'iodure (exprimé en % de ^{125}I libéré dans le milieu) et de la vitesse de sortie
30 de ^{125}I .

Sur la figure 1B, les expériences contrôles permettant d'évaluer la spécificité des molécules testées sur l'activité du canal CFTR ont été réalisées sur des

cellules CHO-CFTR(-), en présence ou non d'activateurs (FSK 1 μ M, octanol-1 1 mM). Dans ces cellules CHO-CFTR(-), l'octanol-1 (0,1 à 5 mM) et la FSK (5 μ M) ne modifient pas significativement le niveau basal de l'efflux de 125 I (figure 1C).

L'effet activateur de l'octanol-1 aussi bien que de la FSK (1 μ M) ou d'une application combinée de FSK et octanol-1 sur CFTR est complètement inhibé par l'addition de glibenclamide (100 μ M) communément utilisé pour inhiber spécifiquement le canal CFTR (Figure 1D). Ces résultats confirment la spécificité de l'octanol-1 sur l'activité de CFTR.

Les cellules CHO-CFTR(+) sont ensuite stimulées avec des concentrations croissantes de FSK ou d'octanol-1, et les constantes de vitesses d'efflux de 125 I sont mesurées. La figure 2 représente une courbe dose-réponse d'octanol-1 (0,1 à 5 mM) ou de FSK (0,1 à 5 μ M) sur l'activation de CFTR. On peut voir sur la figure 2 que l'activation de CFTR par la FSK ou par l'octanol-1 est dépendante de la concentration avec une EC_{50} d'environ 0,5 μ M pour la FSK et de 0,5 mM pour l'octanol-1. Les effets de l'octanol-1 sur l'activation du CFTR sont observables pour des concentrations d'octanol-1 de 0,3 mM à 5 mM, avec un plateau atteint à 1 mM et une dose de demi-activation de 0,5 mM.

De même, l'activation de CFTR par la FSK ou l'octanol-1 est observée en patchi-clamp, en configuration cellule entière. Les figures 3A et 3B montrent respectivement que la FSK (1 μ M) et l'octanol-1 (1 mM) produisent une augmentation d'environ 10 fois de la conductance membranaire par rapport au contrôle. Le potentiel de réversion du courant induit par la FSK ou par l'octanol-1 est de $1 \pm 0,6$ mV, montrant que le Cl^- est l'ion principal qui contribue à ce courant. Ce courant induit par la FSK ou par l'octanol-1 est complètement inhibé par l'application de glibenclamide montrant que c'est bien le canal CFTR qui est impliqué dans le courant induit soit par la FSK soit par l'octanol-1. La figure 3B montre qu'une application d'octanol-1 seul (1 mM), c'est-à-dire sans FSK, induit une pleine activation du canal CFTR.

2.2) L'octanol-1 stimule spécifiquement le canal CFTR dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3).

La capacité de l'octanol-1 à stimuler CFTR dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines (Calu-3) a également été testée. Comme le montre la figure 9A l'octanol-1 active la sortie d'iodure dans les cellules Calu-3. Cet

efflux activé par l'octanol-1 est fortement bloquée par un traitement (1 heure) par le glibenclamide (100 μ M), un inhibiteur du canal CFTR, alors qu'un traitement (1 heure) par 500 μ M de DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-acide disulfonique), utilisé pour bloquer les canaux Cl^- sauf le canal CFTR qui y est insensible, est sans effet (Figure 9B). L'ensemble de ces résultats montre que l'octanol-1 active spécifiquement le canal CFTR humain endogènement exprimé dans les cellules épithéliales bronchiques humaines Calu-3. De plus, comme observé dans les cellules CHO-CFTR(+) (voir figure 1), l'octanol-1 active le canal CFTR humain d'une manière dose-dépendante (0,1 à 10 mM) dans les cellules Calu-3 (Figures 9C, D). Enfin, une courbe dose-réponse d'octanol-1 réalisée en présence de FSK (1 μ M) déplace vers la gauche la courbe dose-réponse d'octanol-1, indiquant une potentialisation par la forskoline de l'activation de CFTR par l'octanol-1. En outre, l'activation du canal CFTR par de l'octanol-1 pour des concentrations supérieures à 0,5 mM est supérieure à celle obtenue par la FSK (1 μ M), puisque l'octanol-1 potentialise l'activité du canal CFTR stimulé par la FSK (1 μ M) (Figures 9C, D).

2.3) *L'octanol-1 active spécifiquement le canal CFTR muté Δ F508 dans des cellules épithéliales d'origine pulmonaire (CF15) de patients atteints de mucoviscidose homozygotes Δ F508.*

La capacité de l'octanol-1 à activer le canal CFTR muté Δ F508 a été testée. La mutation Δ F508 est retrouvée chez plus de 70 % des patients atteints de mucoviscidose. Une grande majorité du canal CFTR muté Δ F508 est dégradée par le système ubiquitine-protéasome à l'intérieur de la cellule, et seulement une très faible quantité de canal muté arrive à la surface de la membrane où il peut être activé. Des cellules épithéliales bronchiques humaines JME/CF15 extraites à partir de patients atteints de mucoviscidose et homozygotes pour la mutation Δ F508 ont été utilisées. La molécule MPB-91, connue pour adresser un certain nombre de canaux CFTR- Δ F508 à la membrane plasmique, (Dormer et al., 2001) a également été utilisée. Les canaux CFTR mutés Δ F508, présents à la membrane plasmique ont été stimulés, par l'octanol-1 (1 mM). La figure 10A montre que l'octanol-1 active spécifiquement le canal CFTR muté Δ F508. Un cocktail de stimulateurs (FSK 10 μ M + génistéine 30 μ M) permet d'obtenir l'activité maximale pour le canal muté CFTR- Δ F508.

L'octanol-1 (1 mM) est capable, à lui seul, d'activer environ 50 % de l'activité maximale du canal CFTR- Δ F508 muté (Figure 10B). Cette activation de CFTR- Δ F508 est inhibée par le glibenclamide (100 μ M) alors qu'elle est insensible au DIDS (500 μ M) (Figure 10C), démontrant que l'octanol-1 stimule spécifiquement le canal CFTR muté Δ F508. De plus, l'octanol-1 n'a aucun effet sur le niveau basal, lorsque le canal muté n'est pas présent à la membrane plasmique, montrant qu'il n'active pas d'autres conductances chlorure et qu'il est bien spécifique du canal CFTR. L'ensemble de ces résultats démontre que l'octanol-1 est capable d'activer le canal CFTR muté Δ F508 dans des cellules épithéliales pulmonaires humaines de patients atteints de mucoviscidose. L'octanol-1 est ainsi d'un grand intérêt pour envisager un traitement pharmacothérapeutique de la mucoviscidose.

2.4) L'effet activateur de l'octanol-1 sur CFTR est réversible

Nous avons enfin examiné à l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière sur les cellules CHO-BQ1 qui expriment le canal CFTR humain, si l'effet de l'octanol-1 (1 mM) sur les canaux CFTR était réversible. Comme indiqué dans la figure 11, on voit que l'octanol-1 (1 mM) entraîne une augmentation de courant due à l'activation de CFTR. Après 15 min de lavage de octanol-1 (1 mM) par une solution saline physiologique, l'activation des canaux CFTR disparaît, indiquant que l'effet activateur de l'octanol-1 sur CFTR est réversible.

2.5) Les n-alkanols à chaîne hydrocarbonée longue (C_6 à C_{10}) activent le canal CFTR (voir figure 12 pour la structure des n-alkanols)

L'effet d'autres n-alkanols que l'octanol-1 sur l'activation de CFTR a également été testé. La figure 4A montre que l'utilisation de n-alkanols ayant des longueurs de chaînes hydrocarbonées égales ou supérieures à celles de l'hexanol-1 (C_6) jusqu'au décanol-1 (C_{10}), active significativement le canal CFTR. L'activation de CFTR augmente en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée (c'est-à-dire en fonction de l'hydrophobicité) de l'alcool. La figure 4 montre une activation croissante de la CFTR suite à l'application d'hexanol-1 (C_6), d'heptanol-1 (C_7), d'octanol-1 (C_8), ou de décanol-1 (C_{10}). Pour des n-alkanols ayant des chaînes hydrocarbonées courtes (éthanol, butanol-1), l'efflux de 125 I n'est pas significativement différent de l'efflux non stimulé, indiquant que l'éthanol et le butanol n'activent pas le canal CFTR.

Sur la figure 4B, on peut voir que l'octanol-2 active aussi la protéine CFTR. Ce qui montre que la position du radical OH sur la molécule en position 1 ou en position 2 n'est pas critique pour l'activation du canal CFTR.

2.6) *L'activation de CFTR par les n-alkanols n'est pas due au*
5 *découplage cellulaire*

L'octanol et les autres n-alkanols peuvent modifier le découplage cellulaire dû aux jonctions communicantes (jonction gap). Un tel découplage est mis en évidence dans des cellules CHO, en mesurant la réponse calcique induite par une application d'ATP. Pour ce faire, une molécule totalement différente des n-alkanols
10 mais connue pour découpler les cellules, l'acide 18-alpha glycerrhetinique (α -GA), a été utilisée. Les figures 5A-C montrent que l'application d' α -GA (10 à 100 μ M) ou d'octanol-1 (1 mM) découple bien les cellules comme le montre la réponse calcique induite par l'ATP. Mais aucun effet de (α -GA) sur l'activité du canal CFTR n'est observé (Fig. 6). L'activation de CFTR par les n-alkanols n'est donc pas due à leur
15 propriété de découplage cellulaire.

2.7) *L'activité de la protéine kinase A est nécessaire à l'activation*
de CFTR par l'octanol-1

La phosphorylation du canal CFTR notamment par la protéine kinase A (PKA) a été montrée comme nécessaire pour la fonction et l'activation du
20 canal. L'activation du canal CFTR par les n-alkanols est inhibée par le traitement avec du H-89 (30 μ M), utilisé pour inhiber les PKA (Figure 5A), ce qui montre qu'une phosphorylation constitutive du canal CFTR est nécessaire à son activation par l'octanol-1.

De récentes études ont montré qu'une phosphorylation de CFTR par
25 la protéine kinase C (PKC) pouvait être un pré-requis pour une activation de CFTR. L'octanol a été montré comme pouvant activer certains sous-types de PKC. Un inhibiteur puissant des PKC en présence d'octanol-1 a donc été utilisé. Dans ces conditions, l'activation de CFTR par l'octanol-1 n'est pas inhibée (figure 7). Ces résultats montrent que l'octanol-1 active bien CFTR par un mécanisme indépendant des PKC.

L'octanol et les n-alkanols peuvent interagir directement avec le canal CFTR au niveau des sites hydrophobes de la protéine, afin d'induire une modification de conformation favorable à son activation.

Les n-alkanols n'induisent pas d'augmentation d'AMPc, l'activation de CFTR par les n-alkanols n'est donc pas due à une élévation du taux d'AMPc induite par les n-alkanols.

La littérature indique que les n-alkanols à chaîne longue ne sont pas des activateurs potentiels de l'adénylate cyclase et donc du niveau d'AMPc intracellulaire mais auraient plutôt un effet inhibiteur. La figure 8 présente les taux d'AMPc intracellulaire dans la cellule CHO-CFTR(+), mesurés après 5 min en présence de 5 μ M ou 1 μ M de FSK (activateur de l'enzyme de synthèse de l'AMPc ; adénylate cyclase), de 1 mM d'octanol-1, d'hexanol-1 ou d'éthanol. Alors que la FSK 1 μ M ou 5 μ M augmente significativement le niveau d'AMPc, ni l'octanol-1, l'hexanol-1 ou l'éthanol ne modifient le niveau basal d'AMPc. Appliqué seul, l'octanol-1 déclenche l'activation du canal CFTR sans augmenter le niveau d'AMPc. Ces résultats montrent que l'octanol- et les autres n-alkanols à chaîne hydrocarbonée longue en C₆ à C₁₀ stimulent le canal CFTR par une voie indépendante de la voie de l'AMPc.

Références Bibliographiques

- 20 Becq et al., (1994). *PNAS* 91 : 9160-9164
Becq et al., (1999). *J. Biol. Chem.* 274: 27415-27425
Chang et al., (1998). *Methods Enzymol.* 92: 616-629
Cutting et al., (1990). *Nature.* 346: 366-369
Dalemans et al., (1991). *Nature.* 354: 526-528
25 Dormer et al., (2001), *J. Cell Sci.*, 114: 4073-4081
Drumm et al., (1991). *Science.* 254: 1797-1799
Eidelman et al., (1992). *PNAS* 89: 5562-5566
Gregory et al., (1991). *Mol. Cell. Bio* 11 : 3886-3893
Gribkoff et al., (1994). *J. Biol. Chem.* 269: 10983-10986

- Griesenbach et al., (1999). *Thorax*. 54 : S19-S23
- Hamill et al., (1981). *Pflugers Arch*. 391 : 85-100
- Marzalec et al., (1994). *J. Pharmacol.Exp. Ther.* 269 : 157-163
- Mascia et al., (2000). *PNAS* 97 : 9305-9310
- 5 Miller & Dallas, (1973). *Arch. Intern. Med.* 131 : 148-155
- Nakahiro et al., (1991). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 : 235-240
- Narahashi et al., (1998). *Toxicol letter*. 100-101 : 185-191
- Reddy et al, (1999). *Nature*. 402 : 301-304
- Riordan et al., (1989). *Science*. 245 : 1066-1073
- 10 Sakihara et al., (2002). *Anesthesiology*. 96 : 428-437
- Schwiebert et al., (1995). *Cell*. 81 : 1063-1073
- Sheppard et al., (1993). *Nature*. 362 : 160-164
- Tabcharani et al., (1991). *Nature*. 352 : 628-631
- Tsui & Buchwald, (1991). *Advances in human genetic* 20 : 153-266
- 15 Wei et al., (1999) *Pflügers Arch*. 438: 635-641
- Weingart & Bukauskas, (1998). *Pflügers Arch*. 435 : 310-319

REVENDEICATIONS

1°) Utilisation des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, ou cyclique en C₆-C₁₀, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies associées à des troubles des canaux chlorure CFTR chez

5 l'homme ou l'animal.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, dans lesquels le groupe OH est en position 1 (alcool primaire) ou en position 2 (alcool secondaire).

10 3°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées cycliques portant un ou plusieurs groupements alcool.

15 4°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdites pathologies sont sélectionnées dans le groupe constitué par la mucoviscidose, les mucoviscidoses atypiques, et les obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives.

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendication 1 à 5, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols se présentent sous une forme adaptée à une administration intra nasale ou buccale.

20 6°) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont présentés sous une forme liquide, pour une administration sous la forme d'un aérosol ou sous la forme d'un nébulisat.

25 7°) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable adapté à ladite administration intra nasale ou buccale.

8°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont administrés à une concentration comprise entre 0,001 % et 0,1 % (v/v), correspondant à une valeur comprise entre 10 et 1000 ppm (parties par million), soit de 10 mg/kg à 1 g/kg.

REVENDICATIONS

1°) Utilisation des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, ou cyclique en C₆-C₁₀, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies associées à des troubles des canaux chlorure CFTR chez
5 l'homme ou l'animal.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées linéaires, ramifiées ou non, dans lesquels le groupe OH est en position 1 (alcool primaire) ou en position 2 (alcool secondaire).

10 3°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont des n-alkanols à chaînes hydrocarbonées cycliques portant un ou plusieurs groupements alcool.

4°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites pathologies sont sélectionnées dans le groupe constitué
15 par la mucoviscidose, les mucoviscidoses atypiques, et les obstructions des voies bronchiques ou des voies digestives.

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols se présentent sous une forme adaptée à une administration intra nasale ou buccale.

20 6°) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont présentés sous une forme liquide, pour une administration sous la forme d'un aérosol ou sous la forme d'un nébulisat.

7°) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont associés à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable
25 adapté à ladite administration intra nasale ou buccale.

8°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que lesdits n-alkanols sont administrés à une concentration comprise entre 0,001 % et 0,1 % (v/v), correspondant à une valeur comprise entre 10 et 1000 ppm (parties par million), soit de 10 mg/kg à 1 g/kg.

1/11

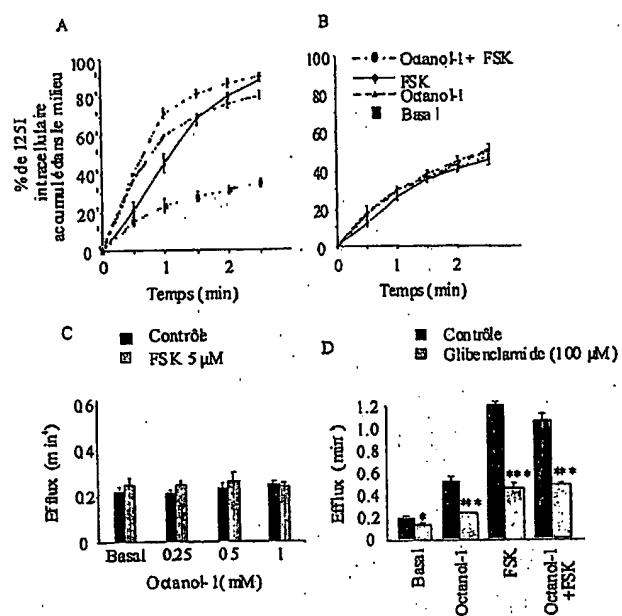


FIGURE 1

2/11

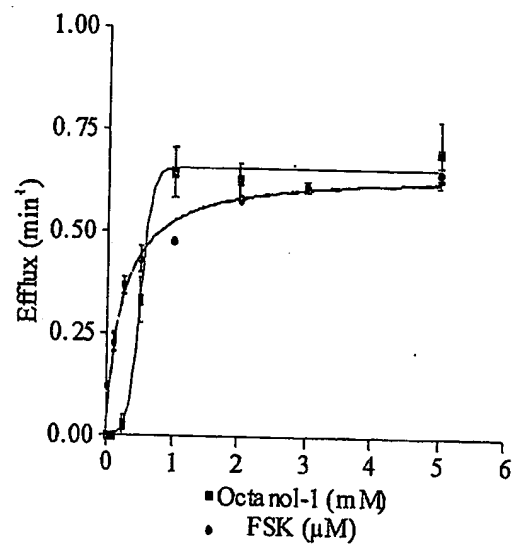


FIGURE 2

3/11

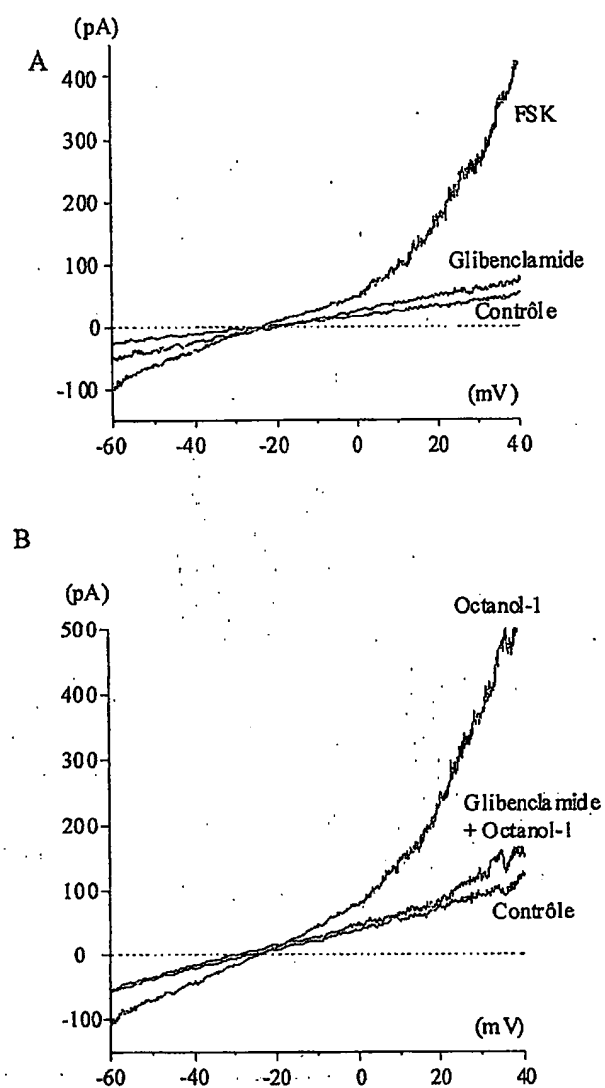
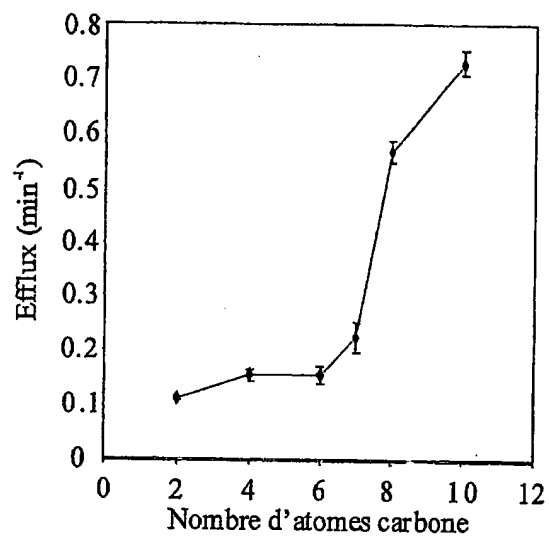


FIGURE 3

4/11

A



B

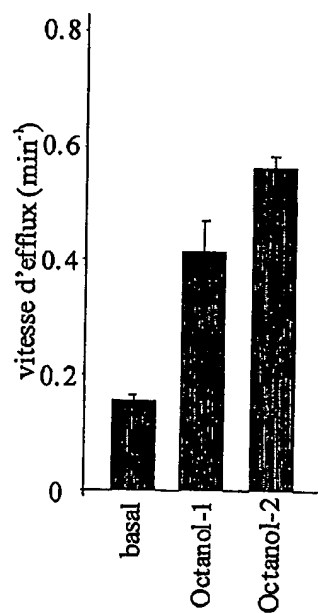


FIGURE 4

5/11

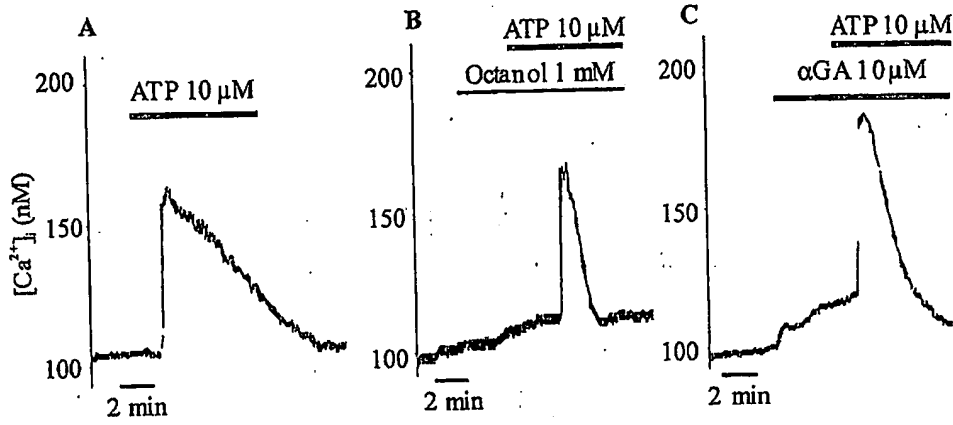


FIGURE 5

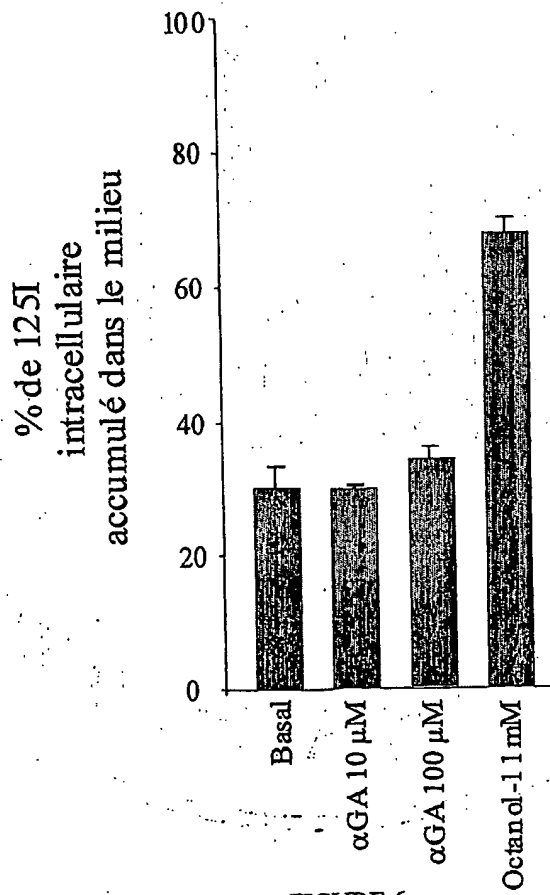


FIGURE 6

6/11

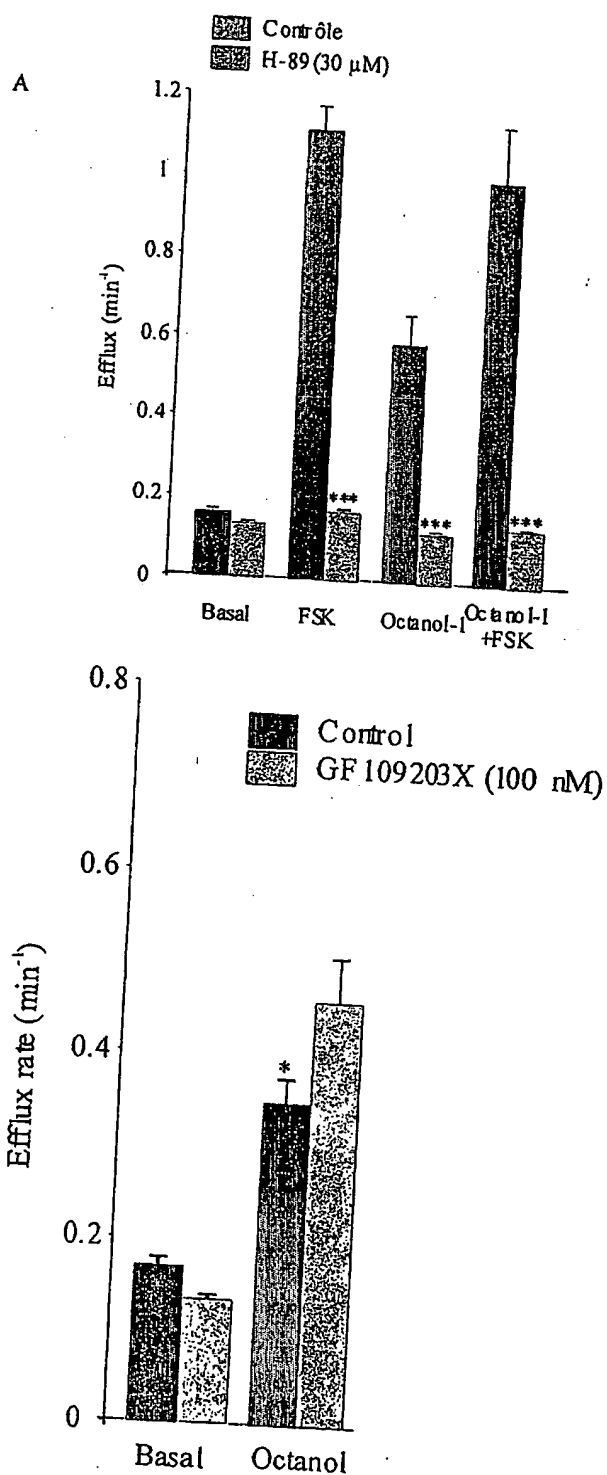


FIGURE 7

7/11

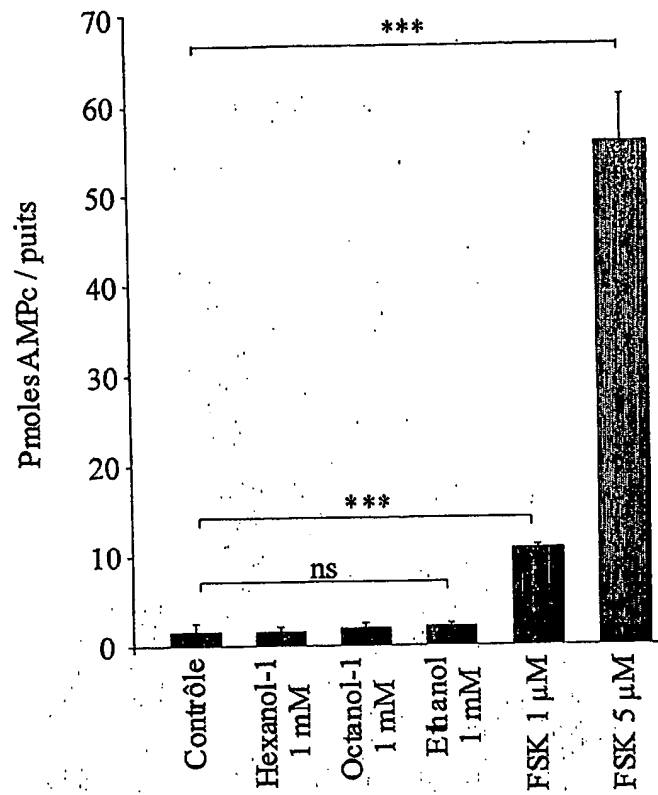


FIGURE 8

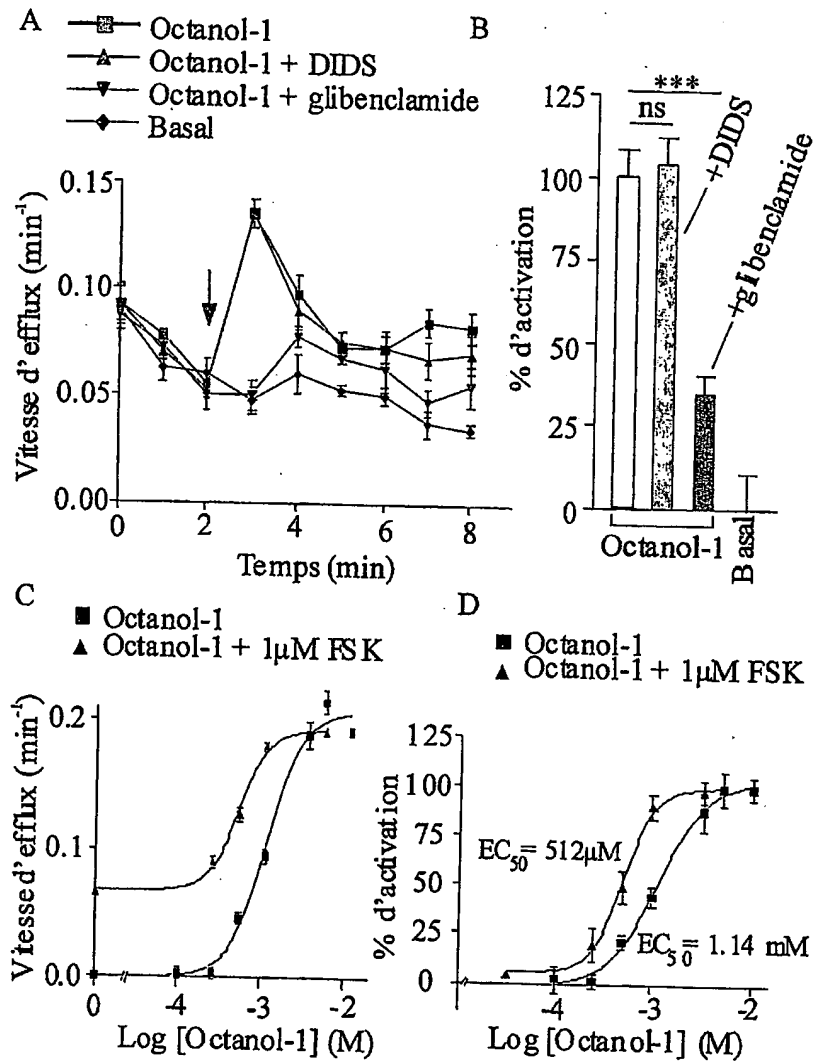


FIGURE 9

9/11

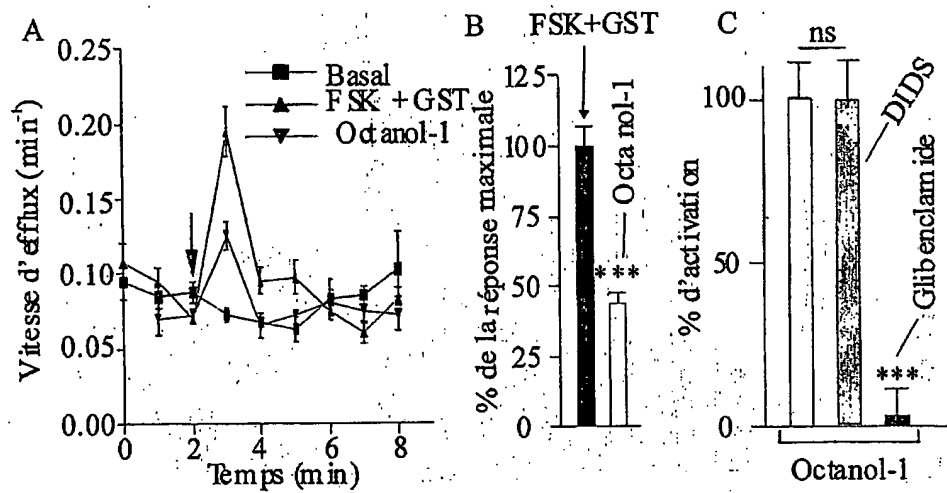


FIGURE 10



10/11

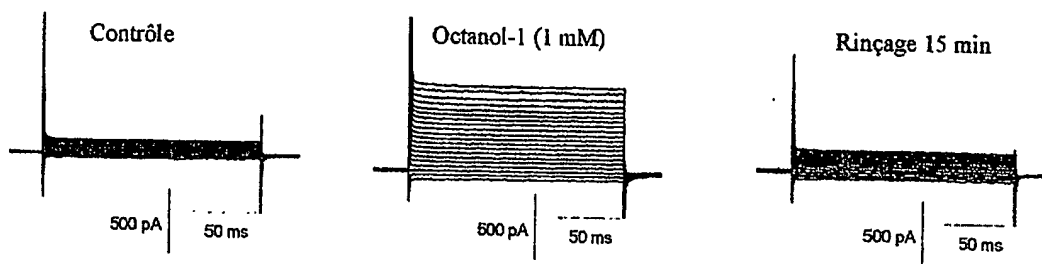


FIGURE 11

11/11

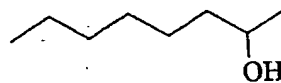
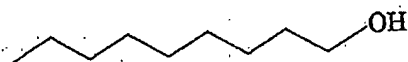
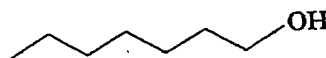
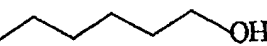
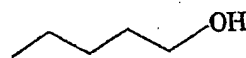
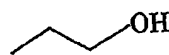
Ethanol: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ Butanol-1: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ Hexanol-1: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{OH}$ Heptanol-1: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{OH}$ Octanol-1: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{OH}$ Decanol-1: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{OH}$ Octanol-2: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{CH}_3$ 

FIGURE 12

reçue le 25/07/03



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 © W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOcp644/107FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0308064
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DES N-ALKANOLS COMME ACTIVATEURS DU CANAL CFTR		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	VERRIER
	Prénoms	Bernard
Adresse	Rue	262 quartier la Roumiguère
	Code postal et ville	13360 ROQUEVAIRE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	MARCE
	Prénoms	Brice
Adresse	Rue	Résidence Les Hauts de Mazargues, Bâtiment B2
	Code postal et ville	13009 MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	DELMAS
	Prénoms	Patrick
Adresse	Rue	IFR Jean Roche
	Code postal et ville	Boulevard Pierre Dramard 13916 MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S)		
DU (DES) DEMANDEUR(S)		
OU DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
Le 2 juillet 2003,		
Béatrice ORES (n° 92-4046)		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

2004/001662



PCT/FR2004/001662



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.